

# CULTIVO DE HEPATOCITOS SOBRE VIDRIO MODIFICADO CON UN POLÍMERO DE PIRROL SINTETIZADO POR PLASMA

**E. Pérez-Tejada<sup>1,3</sup>, L. E. Gómez-Quiróz<sup>2</sup>, J. Morales<sup>3</sup>, M.C. Gutiérrez-Ruiz<sup>2</sup>,  
M.G. Olayo<sup>4</sup>, G. J. Cruz<sup>4</sup>, R. Olayo<sup>3</sup>**

<sup>1</sup>*Departamento de Química,* <sup>2</sup>*Departamento de Ciencias de la Salud,* <sup>3</sup>*Departamento de Física,*  
*Universidad Autónoma Metropolitana Unidad Iztapalapa, Apdo Postal 55-534, Iztapalapa, México, D.F.,*  
*CP 09340, México, oagr@xanum.uam.mx*

<sup>4</sup>*Departamento de Síntesis y Caracterización, ININ, Apdo. Postal 18-1027, M CP 11801, México, D.F.*

## Resumen

En este trabajo se presenta un estudio sobre la modificación superficial de vidrio por medio de plasmas de pirrol para que soporten el crecimiento de células. La meta es crear una superficie rica en aminos que faciliten la proliferación celular. La superficie de vidrio se modificó mediante un reactor cilíndrico de plasma a 13.5 MHz y  $6 \times 10^{-2}$  Torr. El plasma de pirrol se aplicó de forma continua sobre los sustratos durante 10 y 60 min. La afinidad hidrolítica de las superficies modificadas se estudió a través de la técnica de ángulo de contacto. El cultivo celular se realizó sembrando células de hepatocitos HepG2 a diferentes concentraciones iniciales. Se observó el comportamiento de los cultivos celulares con muestras tomadas a intervalos de 24 horas hasta 182 horas, en un microscopio invertido por contraste de fases. El estudio se enfocó en las diferencias cualitativas de la adhesión, morfología y proliferación de células; comparando los datos de células sembradas en soportes de vidrio sin tratar y tratados por plasma, y en cajas de cultivo comerciales de poliestireno.

## Introducción

El diseño y desarrollo de materiales biocompatibles, capaces de interactuar convenientemente con células animales, tiene muchas aplicaciones médicas potenciales. En algunos casos se usan para evitar la adhesión celular o en otros, para incrementarla [1-4]. El objetivo en este trabajo es obtener recubrimientos superficiales de materiales que proporcionen una buena biocompatibilidad interfacial, no estimulativa, para largo tiempo de contacto en cultivos celulares.

Un cultivo celular es un proceso de crecimiento y conservación de células bajo condiciones de laboratorio. Se realiza normalmente en un soporte de cristal o plástico con algún tratamiento orientado a incrementar su hidrofiliidad. El tratamiento usualmente consiste en cubrir la superficie con algún fluido que sustente las necesidades nutritivas de las células y que reciba sus productos de desecho. El fluido debe renovarse periódicamente en condiciones de esterilidad y temperatura controlada.

La habilidad de la superficie en contacto con células, para favorecer o inhibir el crecimiento celular estacionario, puede modificarse con recubrimientos específicos que alteren su capacidad de adhesividad y diferenciación celular. La compatibilidad de estos recubrimientos puede probarse directamente en animales mediante las llamadas pruebas *in vivo* ó en cultivos celulares empleando pruebas *in vitro*. Las pruebas celulares *in vitro* presentan condiciones ventajosas como la reducción drástica del uso de animales de laboratorio, el control del medio fisicoquímico en el que se desarrollan las células, la homogeneidad del cultivo y la posibilidad de observar el proceso en cualquier momento usando microscopía óptica.

El proceso de adhesión celular pasa por varias etapas, en las que se observan cambios cualitativos característicos en la morfología y proliferación de las células sembradas. Inicialmente, cualquier tipo de células tiene forma esférica, diferenciándose morfológicamente de manera paulatina al adherirse. De la calidad de esta adherencia depende su desarrollo, diferenciación y proliferación. En este trabajo se estudian los sustratos más usados en crecimiento

celular: vidrio y poliestireno (PS). Usualmente, el PS es hidrofóbico, pero puede cambiarse hacia superficies hidrofílicas.

La modificación superficial de un sustrato debe ser razonablemente homogénea, aún tratándose de soportes con morfologías complicadas, como es el caso de los implantes de uso médico y dental [5-7]. En este sentido, el tratamiento por plasma puede producir recubrimientos superficiales muy homogéneos sobre morfologías complicadas. El tipo de modificación depende básicamente de la naturaleza de los gases del plasma, del nivel de energía de las partículas en el plasma y de la naturaleza de la superficie.

En este trabajo se estudia el comportamiento cualitativo de superficies de vidrio con y sin recubrimiento de polipirrol (PPy), aplicado mediante polimerización por plasma a baja presión. Se eligió pirrol como compuesto de partida de la modificación superficial de los materiales ya que su composición química con aminas heterocíclicas y sus características de transporte de cargas eléctricas sensibles a la humedad de su entorno lo pueden convertir en un material biocompatible con un gran potencial en aplicaciones médicas [10-14].

### **Sección Experimental**

Se utilizaron cubreobjetos convencionales de vidrio (Corning) y cajas Petri de PS (Corning) como soportes para los cultivos celulares. Se sintetizó polipirrol (PPy) en el interior de un reactor cilíndrico de plasma a baja presión donde previamente se colocaron los cubreobjetos de vidrio de 22x22 mm y las cajas Petri tratadas de 35x10 mm.

El reactor es una cámara tubular de vidrio con tapas roscadas y electrodos de acero inoxidable que opera a frecuencia de 13.5 MHz y presión de  $6 \times 10^{-2}$  Torr; utiliza como fuente de energía un generador RF CESAR 136 de Dressler y una bomba de vacío BC EDWARDS. El pirrol (Aldrich) se alimenta en fase gaseosa a temperatura ambiente. La descarga del plasma de pirrol sobre los sustratos se hizo de forma continua a tiempos de reacción de 10 y 60 min para obtener el sustrato de PPy. Como testigos se usaron cubreobjetos y cajas Petri del mismo lote, pero sin el recubrimiento de PPy.

Para realizar el cultivo celular, los sustratos de vidrio se colocaron dentro de cajas de cultivo y se sembraron células hepáticas (hepatocitos) de cultivo secundario HepG2, con cambio de medio y registro fotográfico de su evolución a intervalos de 24 horas hasta las 182 horas utilizando un microscopio invertido por contraste de fases Zeiss Axiovert 25 y un equipo de fotografía digital adaptado. El medio empleado fue el Williams E W4125 de Sigma, suplementado con suero fetal bovino.

Los hepatocitos son células multifuncionales complejas, de amplio uso en investigación de cultivos celulares; recién sembrados son esféricos y pasado un tiempo, conforme se anclan a la superficie, cambian a morfología poligonal. Estas células solo se multiplican si consiguen adherirse, multiplicación que se favorece a su vez por la cercanía con otras células y que se detiene al recubrir en monocapa toda la superficie disponible, en ese momento se inhibe naturalmente la multiplicación celular. La apariencia, morfología y velocidad de multiplicación están directamente relacionadas con la calidad de la adherencia al sustrato.

### **Resultados y Discusión**

Como el crecimiento y proliferación de las células está afectada por su densidad, por la calidad del medio nutritivo y por el tipo de sustrato, se emplearon los mismos medios de cultivo y dos densidades celulares diferentes:  $2 \times 10^5$  células/ml y  $4 \times 10^5$  células/ml; conservando como variable el sustrato, con y sin recubrimiento de PPy. Todos los experimentos se realizaron por triplicado. En la Fig. 1 se muestran dos cubreobjetos recién sembrados a la

misma concentración celular y medio de cultivo. En la Fig. 1b) se observa que el sustrato de PPy del cubreobjetos tratado se hincha al contacto con el medio nutritivo, presentando irregularidades que no se observan en la Fig. 1a).

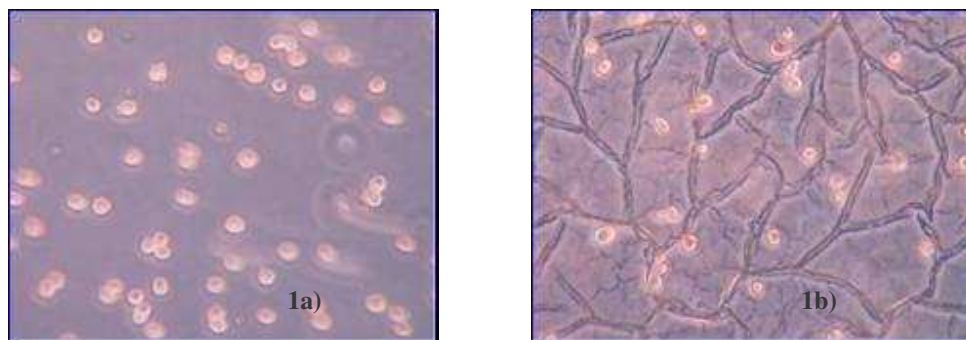


Fig. 1 - ( $2 \times 10^5$  células/ml iniciales, 20x): 1a) Cubreobjetos control 1 sin polímero, con células y medio de cultivo, 1b) Cubreobjetos 1 con tratamiento de plasma de pirrol, con células y medio de cultivo.

A las 24 horas de la siembra, a una concentración inicial de  $4 \times 10^5$  células/ml y antes de renovar el medio de cultivo original, se comparan con soportes de vidrio sin tratar (Fig. 2a), una caja de PS con tratamiento comercial (Fig. 2b) y un soporte de vidrio con tratamiento de PPy, observándose que las células sembradas sobre el polímero crecen y proliferan con mayor rapidez que las sembradas sobre vidrio no tratado o sobre cajas de cultivo comerciales de PS. En todos los casos, la adhesión produce cambios en la morfología, las células presentan una morfología poligonal característica de los hepatocitos.

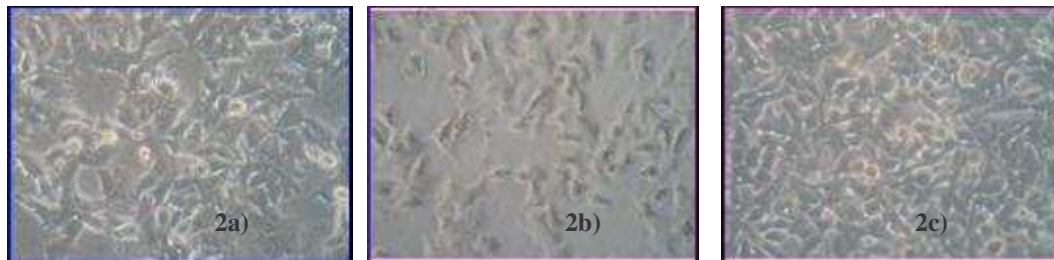


Fig. 2 - Seguimiento a 24 horas de la siembra ( $4 \times 10^5$  células/ml iniciales, 20x): 2a) Cubreobjetos control sin polímero, con células y medio de cultivo, 2b) Células adheridas en la caja de cultivo (PS), 2c) Cubreobjetos 2 con tratamiento de plasma de pirrol, con células y medio de cultivo.

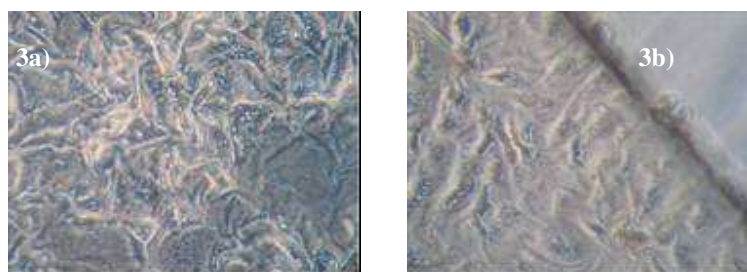


Fig. 3 - Cubreobjetos con polímero a 48 horas de la siembra ( $4 \times 10^5$  células/ml iniciales, 20x), después de cambio de medio y caja: 3a) Centro del cubreobjetos, 3b) Límite del cubreobjetos-caja de cultivo.

La proliferación celular se favorece por contacto; por lo que es usual una mayor densidad en el centro de las muestras, ver Fig. 3. La Fig. 3a muestra una fotografía después de reno-



var el medio y cambiar de caja de cultivo. En la Fig. 3b se compara el centro del cubreobjetos con un extremo del mismo con la caja de PS como fondo. En el cambio de medio las células se desprenden con facilidad de las superficies no tratadas, eliminándose junto con el medio y los desechos producto de la actividad celular.

La superficie sin tratar de la Fig. 4a) tiene una apariencia tersa y uniforme. A diferencia de las superficies tratadas que, al contacto con las soluciones fisiológicas y el agua (Fig. 4b y 4c, respectivamente), presentan hinchamiento en la película de PPy que no se muestra en la superficie sin tratar y que probablemente contribuya a mejorar el anclaje celular.

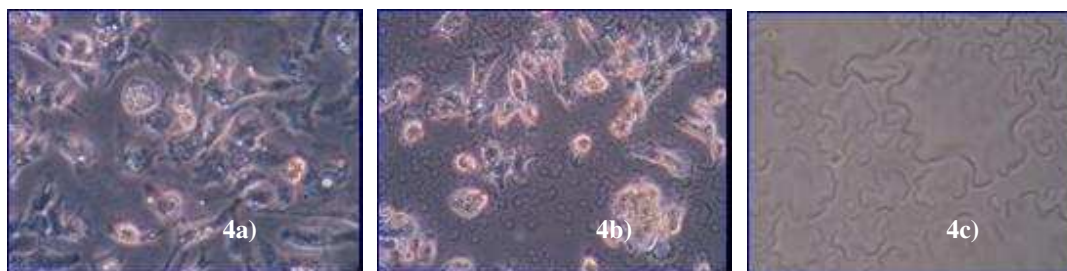


Fig. 4 - ( $2 \times 10^5$  células /ml): 4a) Control, cubreobjetos sin plasma a 24 horas del sembrado (20x), 4b) cubreobjetos con plasma a 24 horas del sembrado (20x), 4c) Cubreobjetos con plasma y agua, sin células (32x).

Se sembraron células a una concentración inicial de  $2 \times 10^5$  células/ml en cubreobjetos del mismo fabricante y lote sin plasma (Fig. 5a, 5b y 5c), y con plasma de pirrol. El experimento se siguió por siete días con cambio de medio cada 24 horas, observándose también diferencias cualitativas en la morfología y proliferación que favorecen a los soportes tratados (Fig. 5d, 5e y 5f).

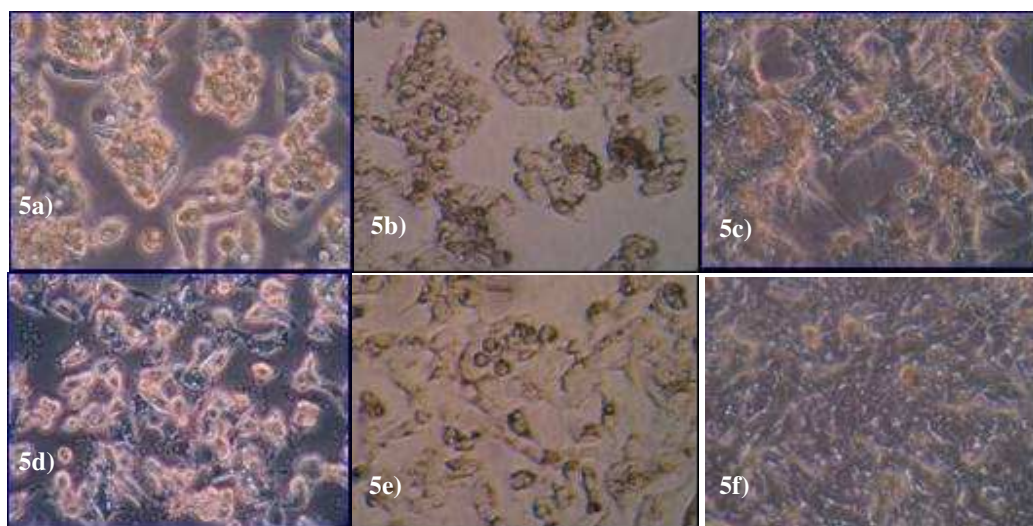


Fig. 5 -  $2 \times 10^5$  células /ml: 5a) Control a 24 hrs., 5b) Control a 72 hrs.), 5c) Control a 168 hrs., d) Cubreobjetos con plasma, 24 hrs., e) Cubreobjetos con plasma, 72 hrs, f) Cubreobjetos con plasma, 168 hrs.

## Conclusiones

De acuerdo a los resultados de los experimentos cualitativos, se observa que un sustrato de PPy sintetizado por plasma incrementa la adhesividad y proliferación de hepatocitos.

## Agradecimientos

Los autores agradecen al programa de mejoramiento del profesorado, PROMEP, Programa de Apoyo a la Incorporación de Nuevos Profesores de Tiempo Completo, CONVENIO PROMEP-UAM Núm. 33805, y al CONACYT con el proyecto de investigación SEP-2004-C01-46467, por el financiamiento parcial al desarrollo del trabajo.

## Referencias

- [1] L.L.Hench, E.C. Ethridge, *Biomaterials An Interfacial Approach*, Ed.; Academic Press, 1982
- [2] Ratner, B., et al, *Biomaterials Science An Introduction to Materials in Medicine*, Ed.; Academic Press, 1996
- [3] Ikada, Y., *Interfacial Biocompatibility, Polymers of Biological and Biomedical Significance*, Ed.; Williams, American Chemical Society, Washington, D.C., 1994.
- [4] Braybrook, J.H., *Biocompatibility Assessment of Medical Devices And Materials*, Ed. ;Wile, 1997
- [5] J. Morales, PhD Thesis, UAM-I, 2001.
- [6] M. van Os, PhD Thesis, *Surface Modification by Plasma Polymerization: Film Deposition, Tailoring of Surface Properties and Biocompatibility*, University of Twente, Enschede, 2000.
- [7] E. Sardella, R. Gristina, et al, *Plasma Process. Polym.* 2004, 1, 63-72.
- [8] F.S .Denes, S. Manolache, *Macromolecular plasma-chemistry: an emerging field of polymer science*, *Prog. Polym. Sci.*, 2004, 29, 815-885.
- [9] M.J. Shenton, G.C. Stevens, *Surface modification of polymer surfaces: atmospheric plasma versus vacuum plasma treatments*, *Journal Of Physics D: Applied Physics*, 2001, 34, 2761-2768.
- [10] J. Woon Lee, F. Serna, J. Nickels, C.E. Schmidt, *Carboxylic Acid-Functionalized Conductive Polypyrrole as a Bioactive Platform for Cell Adhesion*, *Biomacromolecules* 2006, 7, 1692-1695.
- [11] J. Morales, M.G. Olayo, G.J. Cruz, R. Olayo, *Synthesis by Plasma and Characterization of Bilayer Aniline-Pyrrole Thin Films Doped with Iodine*, *Journal of Polymer Science*, 2002, B, 40, 1850-1856.
- [12] G.J. Cruz, J. Morales, R. Olayo, *Films obtained by plasma polymerization of pyrrole*, *Thin Solid Films*, 1999, 342, 119-126.
- [13] M.M. Castillo-Ortega, D.E. Rodríguez , J.C. Encinas, R. Olayo, *Preparation and Characterization of Electroconductive Polypyrrole-Thermoplastic Composites*, *Journal of Applied Polymer Science*, 2001, 81, 1498-1506.
- [14] L.M.H. Groenewoud, PhD Thesis, University of Twente, Enschede, 2000.